



FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TRABAJO FIN DE GRADO

**TÍTULO: Resistencia bacteriana por
formación de biopelículas en pacientes con
fibrosis quística. Nuevas perspectivas de
tratamiento**

Autor: Javier Ruiz Sanz

D.N.I.: 46839719-N

Tutor: D^a. Pilar Gómez Serranillos

Convocatoria: Julio

Resumen/ Abstract

The aim of my work is focused on looking for new drugs combinations to treat the most common bacteria involved in lung infections in patients with cystic fibrosis. It has been notified a biofilm formation in these bacteria that lead resistances to classical antibiotics, hindering the therapeutic target.

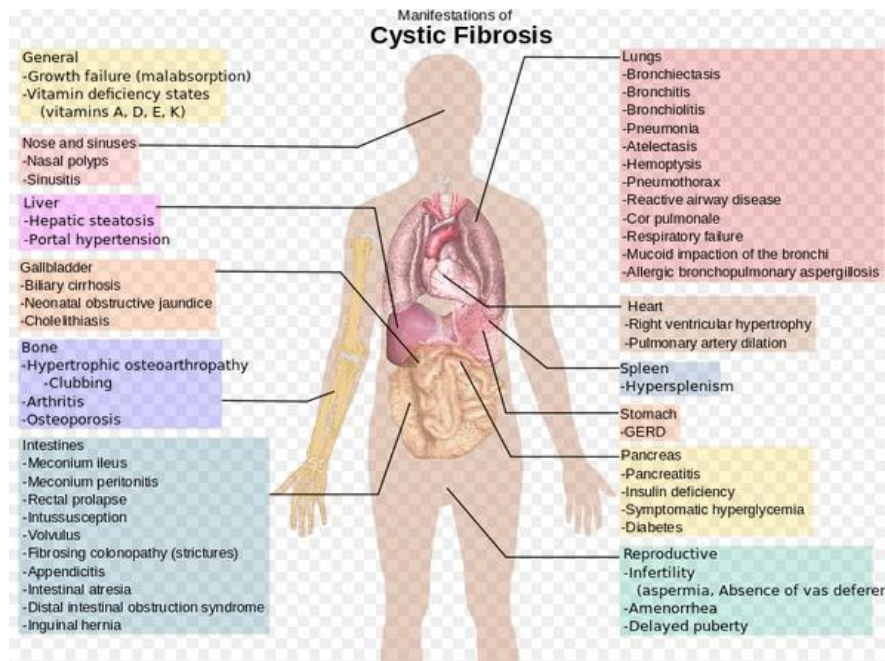
For this reason we've combined the classical antibiotics (as tobramycin) with azoles removed from a library provided to the NIHCC to the UGent.

El motivo de mi trabajo está dirigido a buscar nuevas combinaciones de fármacos o sinergismos, que ayuden al tratamiento de las principales especies bacterianas implicadas en las infecciones pulmonares que padecen los pacientes con fibrosis quística. Entre estas especies bacterianas, que posteriormente especificaremos de forma detallada, se observa una tendencia hacia la formación biopelículas relacionadas con fenómenos de multiresistencia hacia los antibióticos clásicos empleados en el tratamiento de esta patología, lo cual dificulta enormemente la consecución del objetivo terapéutico deseado.

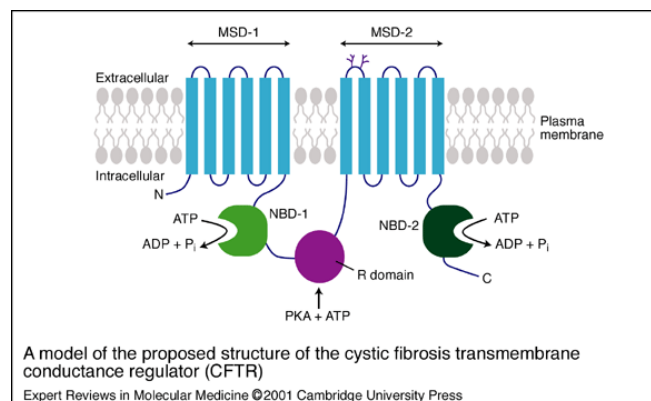
Para ello hemos recurrido al empleo de los antibióticos “clásicos” destinados al tratamiento de estas especies bacterianas en los pacientes con fibrosis quística, junto con una serie de componentes que han sido extraídos de una librería de más de 700 moléculas proporcionadas por el NIHCC a la UGent.

Introducción y Antecedentes

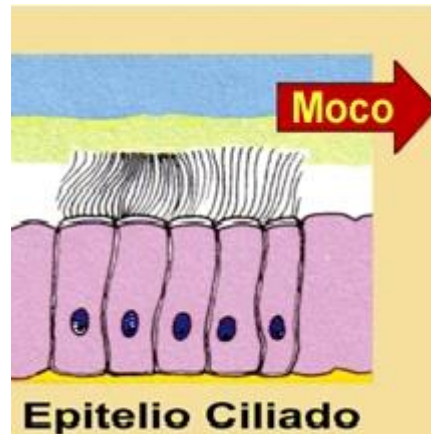
La ¹ **fibrosis quística** es una enfermedad crónica que afecta a los tejidos con secreción exocrina como las glándulas sudoríparas, el páncreas, el intestino, el riñón y el tracto respiratorio inferior. La enfermedad se caracteriza por la producción de mucosidad espesa y pegajosa, que en el caso de los pulmones provoca una alteración de las secreciones normales, lo que facilita la colonización y el desarrollo de infecciones bacterianas.



Según los datos de los que se dispone actualmente, es una de las enfermedades autosómicas recesivas más comunes que afectan a la población blanca. El defecto genético se localiza en el brazo largo del cromosoma 7, donde se encuentra alterado el gen CFTR, el cual codifica para la proteína transmembrana CFTR, la cual constituye un canal de cloro dependiente de protein quinasa A.

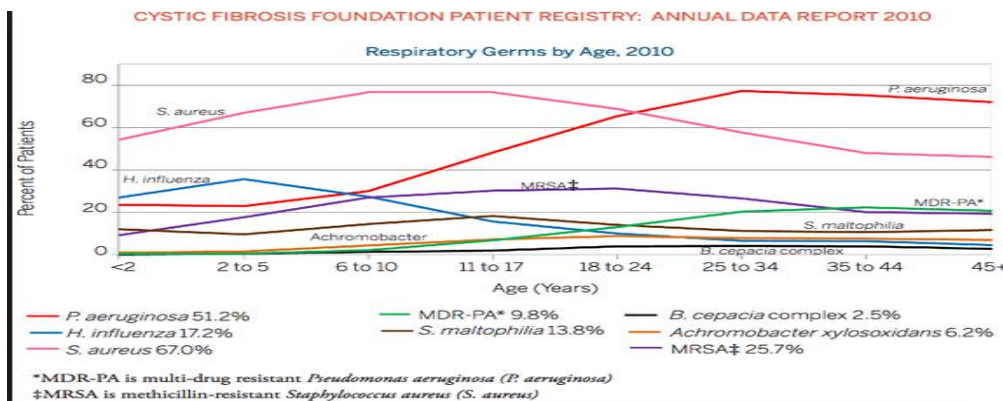


La ² **deficiencia del gen CFTR** se ha relacionado con una disminución del transporte de iones Cl^- a través de las membranas celulares de los tejidos con secreción exocrina. En el caso de los pulmones, se vería afectada la funcionalidad de los cilios implicados en el aclaramiento mucociliar, impidiendo que el moco se renueve, lo cual favorecería enormemente la colonización bacteriana en este tejido.



³ Las primeras bacterias que aparecen en los pacientes que padecen infecciones crónicas son *Staphylococcus aureus* y *Haemophilus influenza*, seguidas de *Pseudomonas aeruginosa* que es considerada como el principal microorganismo patógeno implicado en los pacientes crónicos.

Además tenemos que destacar el *Complejo Burkholderia cepacia (CBC)* por tener un mayor impacto en la calidad de vida de los pacientes con fibrosis quística afectando enormemente a su movilidad y mortalidad.



*Como podemos observar en la presente gráfica *H. influenza* afecta fundamentalmente a niños/as de corta edad, menores de 5 años *S. aureus* tiene una mayor incidencia en niños superiores a los 6 años de edad y adolescentes, mientras que *P. aeruginosa* afecta más a los adultos jóvenes. Asimismo, podemos resaltar que el complejo *B. cepacia* se reparte más homogéneamente en pacientes de distintas edades aunque no lo hace de forma significativa.

No obstante , y de forma reciente, se han identificado otras especies bacterianas , que pese a ser minoritarias debemos tener en cuenta como por ejemplo especies del género *Ralstonia* como *Ralstonia pickettii* y *Ralstonia mannitolilytica*, especies del género *Pandoraea* fundamentalmente *P. apista*, *Achromobacter xylosoxidans* y *Stenotrophomonas maltophilia* , Bacilos Entéricos como *Escherichia Coli* y *Klebsiella Pneumoniae* y especies del complejo *Mycobacterium* no tuberculosis, tales como *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium abscessus* y *Mycobacterium fortuitum*.

Dada la gran diversidad de especies implicadas, mis estudios se centraron en tres especies bacterianas con las que realizamos ensayos *in vitro* : biopelículas de *E.Coli* y *P. aeruginosa*, y células planctónicas de *B. Cenocepacia* LMG 16656. Además con esta última especie bacteriana llevamos a cabo ensayos *in vivo* siguiendo el protocolo de *Galleria mellonella* del que hablaremos posteriormente.

Con objeto de entender mejor el motivo del presente trabajo vamos a abordar en primer lugar diferentes aspectos correspondientes a las biopelículas.

⁴ Biopelículas (Definición) .Son comunidades microbianas complejas fundamentalmente heterogéneas, constituidas por distintos tipos de especies de bacterias (también se han descrito en hongos) , aunque en algunos casos se han hallado biopelículas constituidas exclusivamente por una única especie bacteriana .

Para su formación , descrita a continuación , el microorganismo se encarga de sintetizar y secretar una matriz de protección con capacidad de adhesión a una superficie biótica o abiótica. Las biopelículas conforman por tanto una especie de barrera densa y viscosa, cuyos componentes principales son azúcares y proteínas, y protegen a los microorganismos frente a amenazas externas, limitando la actividad del sistema inmunitario y de los antibióticos.

Son un importante factor de las enfermedades que se caracterizan por una infección bacteriana subyacente, como es el caso que estamos analizando, los pacientes con fibrosis quística, aunque también se han observado de forma frecuente en heridas donde dificultan el proceso de cicatrización y en muchos ⁵ dispositivos médicos de inserción, tales como catéteres urinarios.

En cuanto a su ⁶ **formación** distinguimos entre una serie de **fases**:

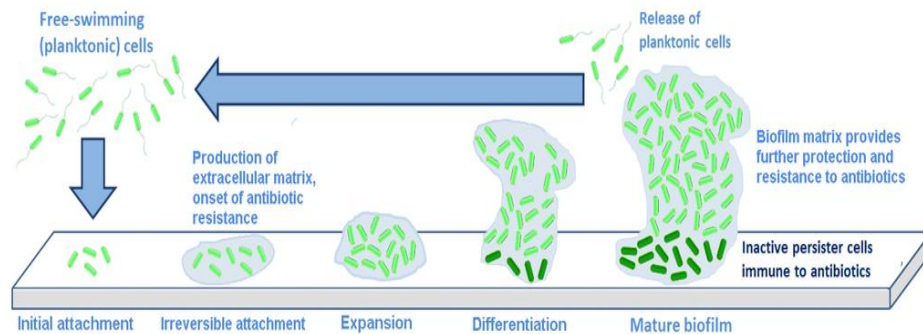
- Primera Fase. Adhesión reversible a una superficie. Los microorganismos normalmente se perciben como seres solitarios que flotan libremente, es decir, en estado planctónico. Sin embargo, en condiciones naturales, la mayor parte de los microorganismos tienden a adherirse a superficies desde donde inician su proliferación.
- Segunda fase. Adhesión irreversible a la superficie. Las bacterias se dividen, se adhieren más firmemente (sésiles) y se diferencian, cambiando patrones de expresión génica para promover la supervivencia. Este proceso se ve facilitado por la comunicación bacteriana, conocida como ⁷ autoinducción o detección de quórum
- Tercera fase. Formación de la biopelícula o matriz protectora viscosa. Una vez adheridas irreversiblemente, las bacterias segregan una matriz circundante conocida como sustancia polimérica extracelular (SPE), la cual ejerce una función protectora. Esta SPE es la precursora de la formación de la biopelícula por parte de las colonias bacterianas. La composición de la SPE varía según los microorganismos presentes, pero por lo general, consta de polisacáridos, proteínas (entre las que se encuentran enzimas), glucolípidos y ADN bacteriano.

Se cree que este ADN bacteriano, liberado por las bacterias, vivas o muertas, proporciona un componente estructural importante en la formación de la matriz de la SPE.

Las biopelículas ya maduras excretan continuas bacterias planctónicas, microcolonias y fragmentos de biopelícula, lo que facilita la dispersión y la colonización de nuevas áreas.

Dado que las biopelículas suelen estar constituidas por un grupo heterogéneo de bacterias, éstas pueden compartir sus mecanismos de resistencia individuales en grupo, lo que facilita la supervivencia del grupo y su protección.

Figure 1. The life cycle of bacteria in biofilms.



Respecto al tiempo de formación los estudios experimentales llevados a cabo en bacterias planctónicas, con gran tendencia hacia la formación de biopelículas, como *E. coli* o *P. aeruginosa* han determinado que:

- La primera adhesión, de tipo reversible, se produce en unos minutos
- Forman microcolonias fuertemente adheridas en un plazo al cabo de 2-4 horas
- Desarrollan la SPE inicial en un plazo de 6 a 12 horas
- Evolucionan a colonias con biopelículas maduras extremadamente resistentes capaces de excretar fragmentos y células planctónicas en un plazo de 2-4 días, en función de la especie y las condiciones de crecimiento.
- Se recuperan rápido de la interrupción mecánica y vuelven a formar biopelículas maduras en un plazo de 24 horas.

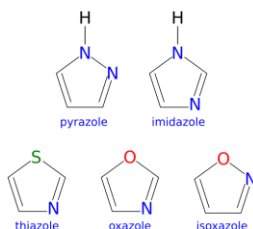
Hemos relacionado la formación de **biopelículas** con fenómenos de **multirresistencia**. Por tanto un aspecto fundamental que tenemos que tratar dentro del presente trabajo, es cómo protegen las biopelículas maduras a las bacterias. Las biopelículas mejoran la tolerancia de los microorganismos adheridos en la matriz hacia el sistema inmunitario, los agentes antimicrobianos y las tensiones ambientales como la limitación nutricional o la falta de oxígeno. Esta tolerancia favorece la resistencia a factores que serían letales para células en estado planctónico.

Se han descrito los siguientes **mecanismos de tolerancia/protección**:

- Bloqueo. Una forma sencilla en la que la SPE protege a los microbios es impidiendo que las moléculas de gran tamaño, como los anticuerpos o las células inflamatorias, penetren profundamente en la matriz de la biopelícula. No obstante la biopelícula puede comportarse como una barrera de difusión, excluyendo también la entrada de moléculas pequeñas como agentes antimicrobianos. Dentro de este mecanismo podríamos incluir también las bombas de expulsión, las cuales se encargarían de expulsar al agente microbiano que ha penetrado en el interior celular.
- Protección mutua. Otra característica exclusiva de las biopelículas polimicrobianas son los efectos cooperativos de protección que diferentes especies de bacterias ejercen entre sí. Por ejemplo, las bacterias resistentes a los antibióticos pueden segregar enzimas protectoras o proteínas fijadoras de antibióticos que pueden proteger a las bacterias colindantes no resistentes a ese antibiótico en una biopelícula.
- Hibernación (bacterias inactivas). Otra estrategia de supervivencia que muchas bacterias han desarrollado es que una subpoblación de bacterias se convierta en metabólicamente inactiva (hibernación). Para que los antibióticos puedan llevar a cabo su efecto requieren de bacterias metabólicamente activas, ya que en muchas ocasiones emplean como dianas sus sistemas enzimáticos. Por lo tanto, una bacteria metabólicamente inactiva carecería de las dianas pertinentes para la acción del agente antimicrobiano.

Con respecto a los **tratamientos** vamos a proceder a explicar los fármacos de elección en los **pacientes con fibrosis quística**.

La **tobramicina** es un antibiótico de amplio espectro que pertenece al grupo de los aminoglucósidos, y que está destinado especialmente para el tratamiento de bacterias Gram negativas, siendo de elección en pacientes con fibrosis quística que padecen infecciones por *P. aeruginosa* (de predominio en pacientes crónicos), *Burkholderia* spp o *E. Coli* (minoritaria). En cuanto a su mecanismo de acción se caracteriza por inhibir la síntesis proteica bacteriana por unión a la subunidad 30S ribosomal.



Materiales y métodos

1- Placas de microtitulación:

- Biopelículas (referencia *E.Coli*). En primer lugar realizamos un cultivo puro de nuestra bacteria de elección, en este caso *E.Coli* , empleando como medio de crecimiento Muller-Hinton. Incubamos nuestra bacteria durante 24 horas a 36°C bajo condiciones de agitación. A continuación procedimos a añadir la bacteria, tras dilución previa, siguiendo patrones estandarizados con la correspondiente lectura en el espectrofotómetro, sobre la placa de microtitulación. Rodeando la región donde se encuentran nuestras biopelículas, los pocillos se rellenaron con agua para evitar su desecación. Asimismo una de las columnas se empleó exclusivamente para añadir medio, sirviéndonos como control de crecimiento, para determinar una posible contaminación. Tras incubar 24 horas a 36 °C (esta vez sin agitación) ,nuestras biopelículas se formaron.

El siguiente paso es el tratamiento : para ello removemos el medio, añadimos agua, que análogamente removeremos quedando la biopelícula adherida al fondo del platillo. Los tratamientos que se pipetearon fueron: tobramicina en un rango de concentraciones de 0 a 8192 μM (en distintas placas) y azoles en un rango de concentraciones de 50-400 μM (bis) . Además de respetar nuestro control de crecimiento, fue necesario habilitar dos columnas o filas para establecer un control de tobramicina y azoles por separado, lo que nos permita comparar los resultados de las combinaciones con el efecto individual de cada uno de estos componente .El tratamiento debe permanecer en contacto con la biopelícula otras 24 horas.

Finalmente procedemos a la cuantificación celular usando una tinción con resarzurina , indicador de oxido-reducción, que nos permite determinar el crecimiento bacteriano.

- Células Planctónicas. A diferencia de las biopelículas, no se requiere esperar 24 horas para su formación, por lo que añadimos directamente la bacteria junto con el tratamiento, y al día siguiente procedemos directamente a la lectura de los resultados.

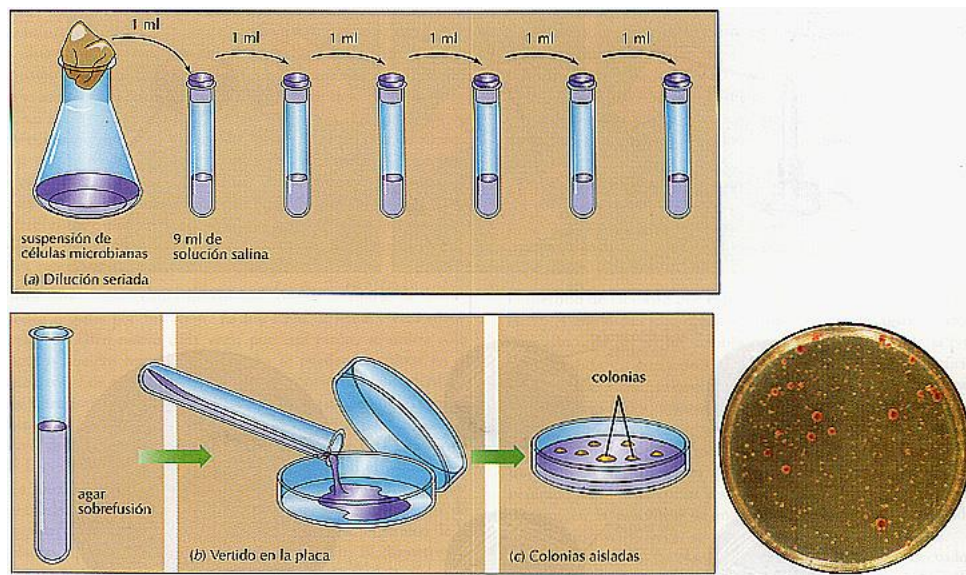
2- Diluciones seriadas sucesivas y cultivo en Placas de Petri (referencia *B. cenocepacia* LMG 16656)

Realizamos un cultivo de nuestra bacteria (36°C y condiciones de agitación). Al día siguiente dividimos nuestra bacterias en 12 tubos de Falcon, de los cuales:

- 3 tubos no contienen tratamiento (Control de Infección)
- 3 tubos contienen tratamiento sólo con Azoles (Control de azoles)
- 3 tubos contienen tratamientos sólo con Tobramicina (control de tobramicina)
- 3 tubos contienen la combinación de Tobramicina + Azoles

Se inocua la bacteria junto con el tratamiento durante 24 horas, y al día siguiente se procede a la realización de diluciones seriadas sucesivas y al emplatado en Placas de Petri para el posterior recuento usando como medio TSA (“Tryptone Soy Agar”) Dado que Burkholderia es una bacteria de crecimiento lento, cultivaremos la misma durante 24 horas a 36 °C, pero la cuantificación no se podrá llevar a cabo hasta las 48-72 h.

En la siguiente página se propone de forma esquemática el procedimiento descrito



3- Resultados in vivo: protocolo con *Galleria mellonella*

En primer lugar dividimos las larvas en tres grupos homogéneos según un criterio de peso : menores de 450 g, de 450 a 550 g y mayores de 550 g . En cada placa de Petri añadiremos dos larvas de cada peso, teniendo un total de 6 larvas/placa.

Infectamos las larvas de *Galleria mellonella* con *B. cenocepacia* LMG 16656. Tenemos que establecer los mismos grupos de control que hemos especificado anteriormente: unas larvas fueron infectadas y no recibieron tratamiento (infectadas + suero fisiológico) , otras larvas fueron tratadas con los azoles correspondientes o tobramicina individualmente , y el tercer grupo recibió ambos tratamientos en combinación. La cantidad de bacteria y tratamiento inyectada es siempre homogénea.

Incubamos los gusanos durante 24 h a 36°C, posteriormente estableceremos un recuento de los gusanos vivos o muertos al cabo de 24, 48 y 72h.

Los gusanos tienen que ser triturados y a continuación realizamos diluciones seriadas sucesivas y el emplatado en Placas de Petri usando medio específico para *Burkholderia cepacia*.

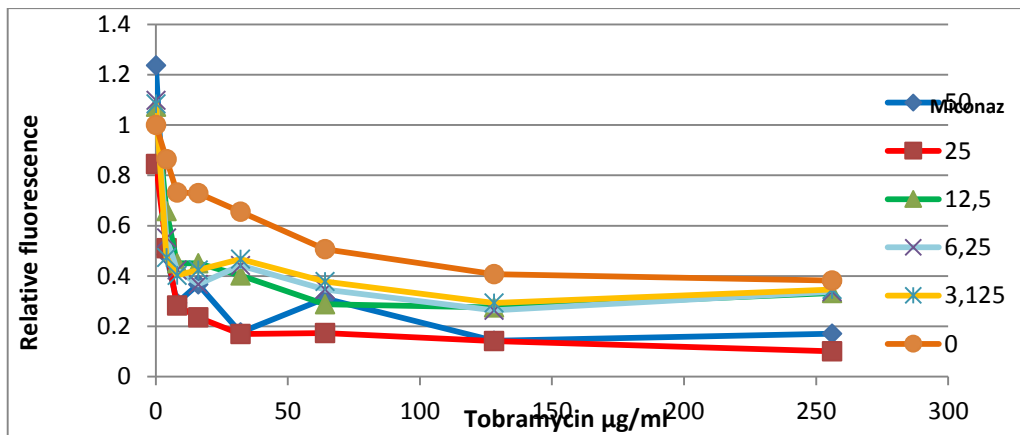
Las placas de Petri se incuban durante 24h a 36°C y a partir de las 48h podemos realizar el recuento.



Resultados

Placas de microtitulación

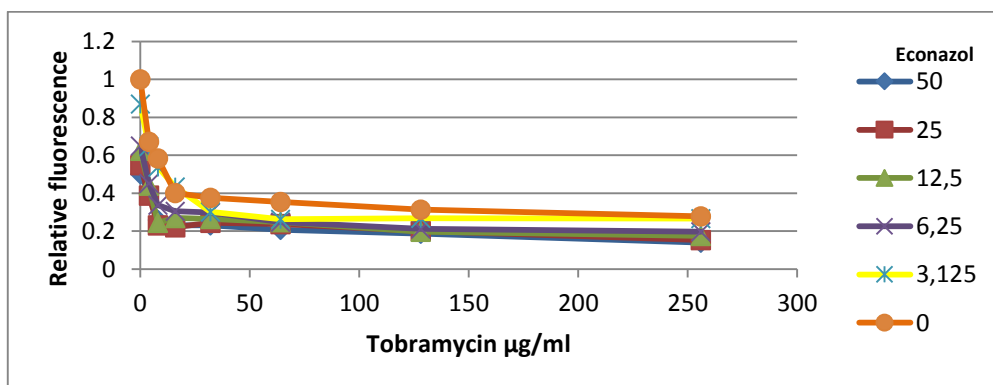
Tobramicina + Miconazol en biopelículas de *E.Coli*



Como podemos ver en la gráfica las combinaciones de Tobramicina + Miconazole proporcionaron una fluorescencia relativa menor (eje Y), lo que es indicativo de un menor número de bacterias de *E.Coli* productoras de biopelícula con respecto a los pocillos tratados exclusivamente con Tobramicina. Este efecto es más remarcado a medida que aumentamos la concentración de Miconazole.

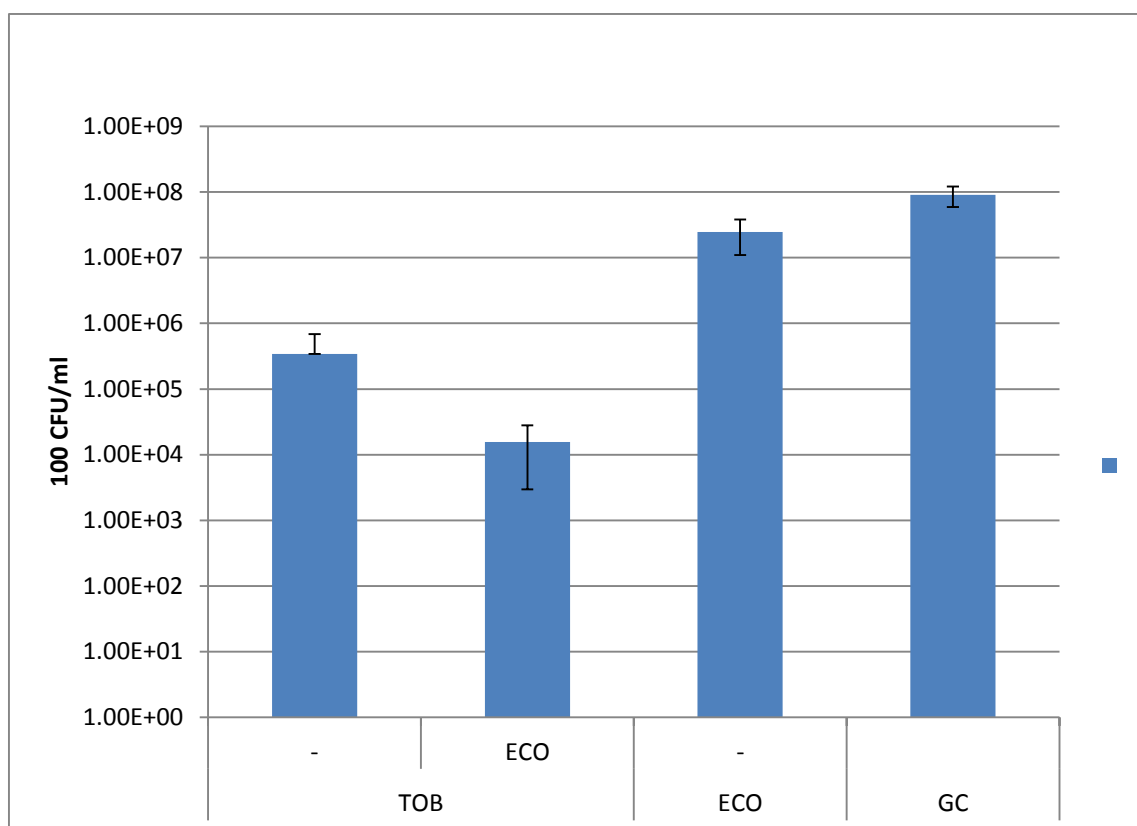
Por lo tanto, y a raíz de los resultados obtenidos, podríamos sugerir la existencia de un sinergismo entre ambos componentes en el tratamiento de las biopelículas.

Tobramicina + Econazol en biopelículas de *E.Coli*



A raíz de los resultados se desprende análogamente que las combinaciones de Tobramicina + Econazole tuvieron mayores efectos sobre la mortalidad de las biopelículas de *E.Coli*, lo que nos permitiría postular un posible sinergismo entre la Tobramicina y algunos azoles. Resultados semejantes han sido descritos simultáneamente con otros azoles como oxiconazole y ketoconazole.

Diluciones seriadas sucesivas y cultivo en Placas de Petri con células planctónicas de *B. cenocepacia* LMG 16656



Sobre las células planctónicas de *B.cenocepacia* LMG 16656 podemos observar que el Econazol, por si mismo carece de efecto. La Tobramicina, antibiótico de referencia, si que presentó un efecto sobre las células planctónicas , pero no tan marcado como la combinación de Tobramicina + Econazole, que se postuló como la más eficaz, lo que nos lleva a pensar que este efecto sinérgico no es exclusivo de las biopelículas sino que también sería extensible a células en estado planctónico.

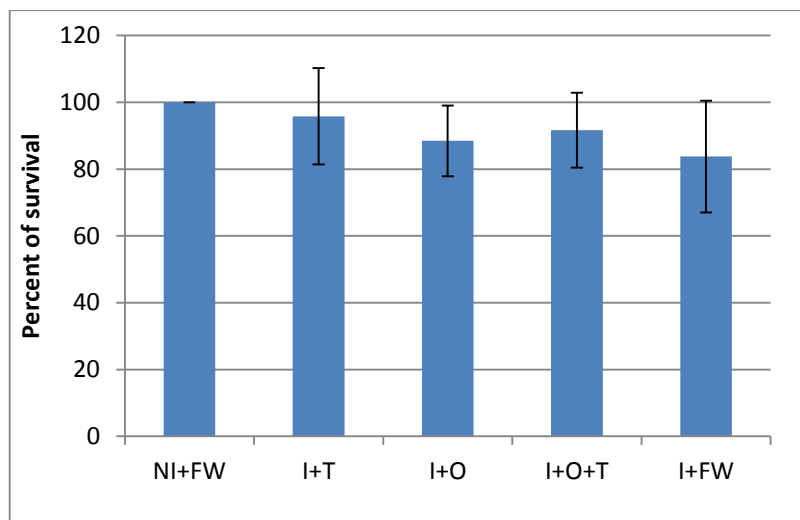
Protocolo con *Galleria Mellonella*

Primera parte : % de supervivencia

*Leyenda :

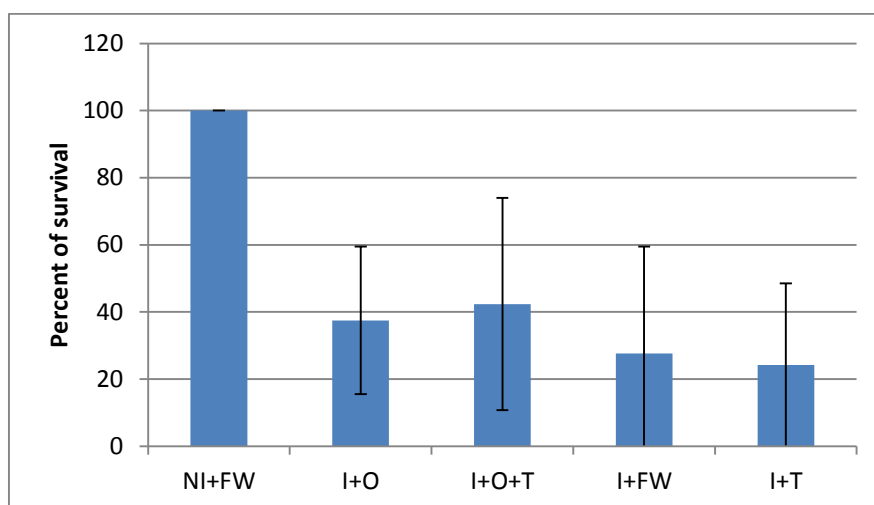
- NI+ FW = Larvas no infectadas (+ suero fisiológico). Control estado larvas
- I+ FW= Larvas infectadas (+ suero fisiológico). Control de infección
- I + T = Larvas infectadas tratadas con Tobramicina
- I+ O = Larvas infectadas tratadas con Oxiconazole
- I + O + T = Larvas infectadas tratadas con Tobramicina + Oxiconazole

Resultados tras 24horas



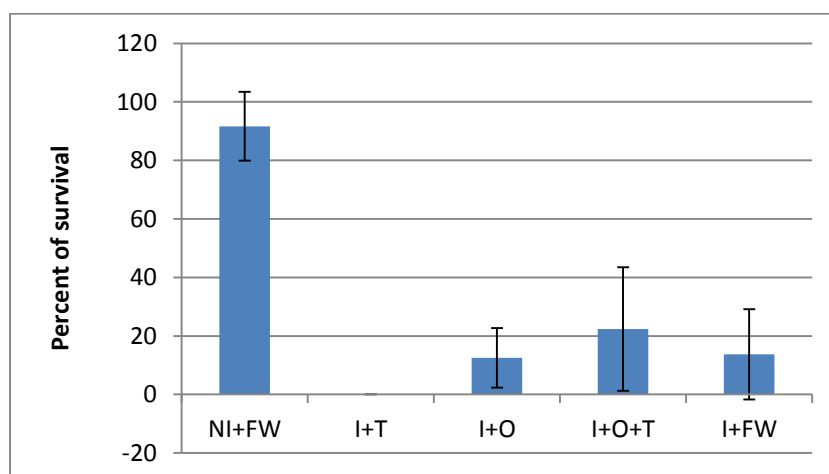
Si tomamos como referencia la combinación de Tobramicina + Oxiconazole sobre las larvas infectadas podemos observar que el porcentaje de supervivencia fue mayor que en las larvas infectadas que no reciben tratamiento y que en las larvas infectadas y tratadas exclusivamente con Oxiconazole . Sin embargo no podemos notificar ninguna diferencia, siendo incluso la supervivencia menos marcada, con la combinación de Tobramicina + Oxiconazole con respecto a la Tobramicina por si misma.

Resultados tras 48 horas



Tras 48 horas, en cambio, podemos observar que la combinación de Tobramicina + Oxiconazole ofreció mejores resultados en la supervivencia de las larvas que la Tobramicina de forma exclusiva.

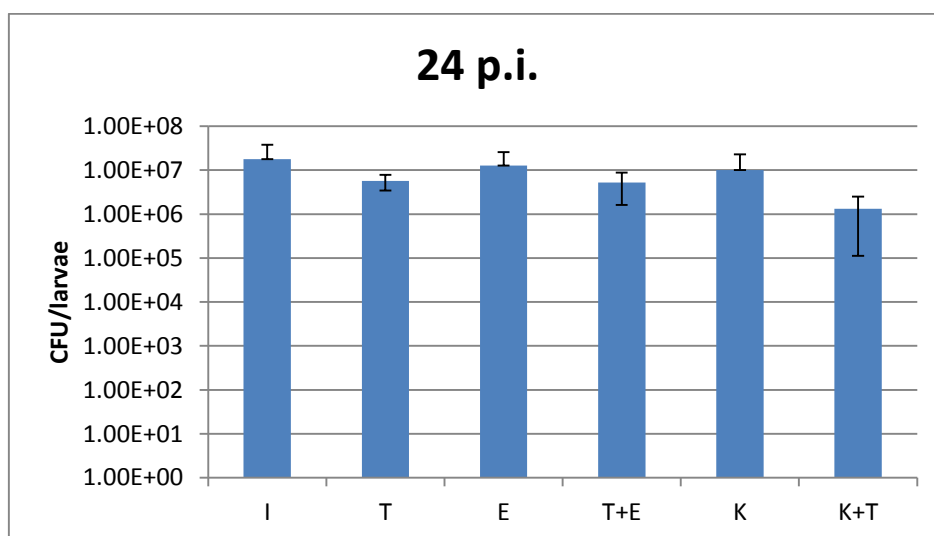
Resultados tras 72 horas



En analogía se observa que la combinación de Tobramicina + Oxiconazole ofreció mejores resultados que la Tobramicina.

Análisis final de los resultados. La alta tasa de supervivencia de bacterias tratadas exclusivamente con Oxiconazole, a priori sin efectos tal y como los otros experimentos han demostrado, nos sugirió un posible error en el procedimiento a distintos niveles. No obstante el hecho de que la combinación de Tobramicina + Oxiconazole tenga un papel más remarcado en la tasa de supervivencia de las larvas tras 48 y 72 horas, que la Tobramicina por si misma nos ayudaría a corroborar la posible hipótesis de un sinergismo entre ambos componentes, lo cual guardaría relación con los resultados expuestos, con otros azoles, en la microtitulación en placa.

Segunda parte : recuento de colonias en placas de Petri



Si tomamos como referencia la combinación Tobramicina + Ketoconazole (K+T) podemos notificar la presencia de un menos número de unidades formadoras de colonias/larva que en el caso de la Tobramicina y el Ketoconazol por separado.

Discusión

El desmedido uso de antibióticos en el tratamiento de estas infecciones, ha conducido a la aparición de cepas resistentes o multirresistentes, dificultado su tratamiento posterior. La formación de biopelícula por muchos patógenos, es de interés como mecanismo de patogenicidad, porque ha sido relacionado con infecciones reincidentes y persistentes. Por otro lado, se ha relacionado a los biopelículas con el incremento de la resistencia a los antibióticos, y se han asociado con algunos dispositivos médicos, como prótesis y catéteres.

La dificultad para introducir en el mercado nuevas moléculas de antibióticos, que sean eficaces en el tratamiento de infecciones bacterianas, especialmente en aquellas multirresistentes por formación de biofilms, nos ha llevado a plantearnos la necesidad de buscar nuevas combinaciones o sinergismos entre diversas moléculas.

Las nuevas combinaciones entre la tobramicina, antibiótico de tipo aminoglucósido, de amplio espectro frente a bacterias Gram negativas junto con azoles (miconazol y econazol) demostró una mayor eficacia *in vitro* (sobre placas de microtitulación) en el tratamiento de biopelículas de *E.Coli* que la tobramicina de forma aislada. Se empleó como parámetro para cuantificar la mortalidad bacteriana la fluorescencia relativa, con el correspondiente incremento de la mortalidad para dosis equivalentes de tobramicina a medida que aumentamos la concentración de azol (μM).

Asimismo la combinación de tobramicina junto con econazol, en células planctónicas de *B.cenocepacia* LMG 16656 ha evidenciado una mayor eficacia en los ensayos *in vitro* (tras diluciones seriadas sucesivas y cultivo en placas de Petri) que la tobramicina o el econazol (sin efecto bactericida aparente) de forma aislada. En este caso se determinó 100 UFC/ ml (100 unidades formadoras de colonias por ml) siendo en analogía la combinación mayor con la asociación de ambas moléculas.

Asimismo se trató de extrapolar estos resultados *in vitro* a un modelo *in vivo* con *Galleria Mellonella* infectadas también con células planctónicas de *B.cenocepacia* LMG 16656. En primer lugar se evaluaron los porcentajes de supervivencia tras 24, 48 y 72 horas. A las 24 horas no se obtuvieron datos significativos , pero tras 48 y 72 horas si que se obtuvieron mejores resultados con la combinación Tobramicina + Oxiconazol que con la tobramicina de forma aislada. No obstante estos resultados se consideraron como no significativos debido a que el oxiconazol (de forma aislada y sin efecto bactericida) y las larvas no tratadas ofrecieron porcentajes de supervivencia en algún momento del recuento. Esto podría poner de manifiesto un error durante la manipulación de las larvas, que resulta habitual durante el proceso de inyección de la carga bacteriana.

En segundo lugar repetimos este experimento pero en vez de centrarnos en la tasa de supervivencia tratamos de cuantificar las UFC/larva tras 24 horas. Observamos que en este caso las combinaciones Tobramicina + Econazol y Tobramicina + Ketoconazol fueron cuantitativamente superiores a la Tobramicina de forma aislada.

Conclusiones

Estudios anteriores con biopelículas de diferentes especies de *Burkholderia cenocepacia* han demostrado un sinergismo ente la Tobramicina + Azoles.

1. Hemos observado que este sinergismo , a falta de los ensayos en placas de microtitulación, podría ser extensible también a células planctónicas de *Burkholderia cenocepacia* LMG 16656.
2. Hemos confirmado el sinergismo en otras biopelículas de bacterias Gram negativas, como *E.Coli*

3. Los resultados en los modelos *in vivo* no fueron significativos para concluir que la combinación Tobramicina + Azoles se traduzca en un mayor % de supervivencia entre las larvas de *Galleria Mellonella*. No obstante, en una segunda fase, al cuantificar las UFC/larva la combinación se mostró como más eficaz en cuanto a mortalidad bacteriana que la tobramicina aislada.
4. Combinaciones de Tobramicina+ Azoles podrían suponer una nueva estrategia farmacológica en el tratamiento de las infecciones pulmonares en los pacientes con fibrosis quística.

Bibliografía

- 1- Alejandro A. Pezzulo, Xiao Xiao Tang, Mark J. Hoegger, Mahmoud H. Abou Alaiwa, Shyam Ramachandran, Thomas O. Moninger, Phillip H. Karp, Christine L. Wohlford-Lenane, Henk P. Haagsman, Martin van Eijk, Botond Bánfi, Alexander R. Horswill, David A. Stoltz, Paul B. McCray, Michael J. Welsh & Joseph Zabner. Reduced airway surface pH impairs bacterial killing in the porcine cystic fibrosis lung. *Nature* 2012 ; 487 109–113
- 2- Isabelle Sermet-Gaudelus, Jacques de Blic, Muriel LeBourgeois, Iwona Pranke, Aleksander Edelman and Bonnie W. Ramsey. Potentiating and correcting mutant CFTR in patients with cystic fibrosis. *Faculté de Medicine René Descartes, Paris France* 2014; 64: 129-149
- 3-Dana Willner ,Matthew R Haynes, Mike Furlan, Robert Schmieder, Yan Wei Lim, Paul B Rainey ,Forest Rohwer and Douglas Conrad. Spatial distribution of microbial communities in the cystic fibrosis lung .*The ISME Journal* 2012 6, 471–474
- 4- Oscar A. McCrate, Xiaoxue Zhou, Courtney Reichhardt, Lynette Cegelski Sum of the Parts: Composition and Architecture of the Bacterial Extracellular Matrix *Journal of Molecular Biology* 2013
- 5- Jaideep Banerjee ,Piya Das Ghatak ,Sashwati Roy,Savita Khanna,Craig Hemann,hBinbin Deng, Amitava Das,Jay L. Zweier,Daniel Wozniak,Chandan K. Sen Silver-Zinc Redox-Coupled Electroceutical Wound Dressing Disrupts Bacterial Biofilm *Journal plos* 2015 DOI: 10.1371

- 6- Poovendran Ponnusamy, Vidhya Natarajan, Murugan Sevanan *In vitro* biofilm formation by uropathogenic *Escherichia coli* and their antimicrobial susceptibility pattern Asian Pacific Journal of Tropical Medicine 183 (2001), pp. 6746–6751
- 7- Gilles Brackman, Paul Cos, Louis Maes, Hans J. Nelis and Tom Coenye Quorum Sensing Inhibitors Increase the Susceptibility of Bacterial Biofilms to Antibiotics In Vitro and In Vivo. American Society of Microbiology 2011 81:2 774-782
- 8- Boo Shan Tseng, Wei Zhang, Joe J. Harrison, Tam P. Quach, Jisun Lee Song, Jon Penterman, Pradeep K. Singh, David L. Chopp, Aaron I. Packman and Matthew R. Parsek* The extracellular matrix protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by limiting the penetration of tobramycin sfam . Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2013 2865–2878,
- 9-César de la Fuente-Núñez, Victoria Korolik, Manjeet Bains, Uyen Nguyen, Elena B. M. Breidenstein, Shawn Horsman, Shawn Lewenza, Lori Burrows and Robert E. W. Hancock. Inhibition of Bacterial Biofilm Formation and Swarming Motility by a Small Synthetic Cationic Peptide. Griffith University 2012.